

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 A61K 39/395, 9/08, 9/19, 47/26, 47/34 // C07K 16/36, C12P 21/08		A1	(11) 国際公開番号 <b>WO00/66160</b>
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02784		(43) 国際公開日 2000年11月9日(09.11.00)	
(22) 国際出願日 2000年4月27日(27.04.00)			
(30) 優先権データ 特願平11/121424 1999年4月28日(28.04.99)	JP	(74) 代理人 長井省三, 外(NAGAI, Shozo et al.) 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo, (JP)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
(72) 発明者 ; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 岡田 昭(OKADA, Akira)(JP/JP) 森 淳英(MORI, Atsuhide)(JP/JP) 〒425-0072 静岡県焼津市大住180 山之内製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) 小林 貢(KOBAYASHI, Mitsugu)(JP/JP) 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社内 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title: PARENTERAL MEDICINAL COMPOSITION CONTAINING HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODY FRAGMENT AND METHOD FOR STABILIZING THE SAME

(54) 発明の名称 ヒト型化モノクローナル抗体フラグメント含有非経口用医薬組成物およびその安定化方法

(57) Abstract

A parenteral medicinal composition which contains a humanized monoclonal antibody fragment, a nonionic surfactant and sugars and has a weakly acidic pH value; and a method for stabilizing a humanized antibody fragment by blending therewith a nonionic surfactant and sugars and adjusting the pH value to a weakly acidic level. Thus, it is possible to provide a parenteral medicinal composition or a parenteral medicinal preparation containing a stabilized humanized monoclonal antibody fragment which is free from any restrictions in using, for example, storage in a cold place avoiding freezing, transportation/handling avoiding shaking, and filtering off particles in using.

本発明は、ヒト型化モノクローナル抗体フラグメント、非イオン性界面活性剤、および糖類を含有してなり、pHが弱酸性である非経口用医薬組成物に関する。また本発明は、非イオン性界面活性剤、および糖類を配合し、pHを弱酸性にすることにより、ヒト型化抗体フラグメントを安定化させる方法に関するものである。

本発明によれば、凍結を避けた冷所保存、振盪を避けた移送・取扱い、用時フィルターによる除粒子操作等の使用制限のない、安定なヒト型化モノクローナル抗体フラグメントを含有してなる非経口用医薬組成物または非経口用医薬製剤を提供することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	K Z	カザフスタン	R U	ロシア
A G	アンティグア・バーブーダ	D Z	アルジェリア	L C	セントルシア	S D	スードーン
A L	アルバニア	E E	エストニア	L I	リヒテンシュタイン	S E	スウェーデン
A M	アルメニア	E S	スペイン	L K	スリ・ランカ	S G	シンガポール
A T	オーストリア	F I	フィンランド	L R	リベリア	S I	スロヴェニア
A U	オーストラリア	F R	フランス	L S	レソト	S K	スロヴァキア
A Z	アゼルバイジャン	G A	ガボン	L T	リトアニア	S L	シエラ・レオネ
B A	ボスニア・ヘルツェゴビナ	G B	英国	L U	ルクセンブルグ	S N	セネガル
B B	バルバドス	G D	グレナダ	L V	ラトヴィア	S Z	スウェーデン
B E	ベルギー	G E	グルジア	M A	モロッコ	T D	チャード
B F	ブルガリア・ファン	G H	ガーナ	M C	モナコ	T G	トーゴー
B G	ブルガリア	G M	ガンビア	M D	モルドヴァ	T J	タジキスタン
B J	ベナン	G N	ギニア	M G	マダガスカル	T M	トルクメニスタン
B R	ブラジル	G R	ギリシャ	M K	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T R	トルコ
B Y	ベラルーシ	G W	ギニニア・ビサオ	共和国		T T	トリニダッド・トバゴ
C A	カナダ	H R	クロアチア	M L	マリ	T Z	タンザニア
C F	中央アフリカ	H U	ハンガリー	M N	モンゴル	U A	ウクライナ
C G	コンゴー	I D	インドネシア	M R	モーリタニア	U G	ウガンダ
C H	スイス	I E	アイルランド	M W	マラウイ	U S	米国
C I	コートジボアール	I L	イスラエル	M X	メキシコ	U Z	ウズベキスタン
C M	カムルーン	I N	インド	M Z	モザンビーク	V N	ベトナム
C N	中国	I S	アイスランド	N E	ニジエール	Y U	エジプト
C R	コスタ・リカ	I T	イタリア	N L	オランダ	Z A	南アフリカ共和国
C U	キューバ	J P	日本	N O	ノルウェー	Z W	ジンバブエ
C Y	キプロス	K E	ケニア	N Z	ニュージーランド		
C Z	チエシコ	K G	キルギスタン	P L	ポーランド		
D E	ドイツ	K P	北朝鮮	P T	ポルトガル		
D K	デンマーク	K R	韓国	R O	ルーマニア		

## 明細書

ヒト型化モノクローナル抗体フラグメント含有非経口用医薬組成物  
およびその安定化方法**技術分野**

本発明は、ヒト型化モノクローナル抗体フラグメントを含有してなる安定な非経口用医薬組成物に関する。特に、本発明は、ヒト血小板膜糖タンパク質G P I I b / I I I a のフィブリノーゲン受容体に対するヒト型化モノクローナル抗体の F a b フラグメントを含有してなる安定な非経口用医薬組成物に関するものである。また、本発明は、非イオン性界面活性剤、および糖類を配合し、p H を弱酸性にすることによるヒト型化モノクローナル抗体フラグメントの安定化方法に関するものである。

**背景技術**

モノクローナル抗体を遺伝子工学的に大量に产生する方法が提案されて以来、医薬品分野において、モノクローナル抗体は広く利用されている。

近年、米国Centocor社は、ヒト・マウス・キメラ・モノクローナル抗体フラグメントからなる「ReoPro（商品名）」を開発し、血小板凝集阻害剤として医療の現場に提供している。本製剤は、キメラモノクローナル抗体フラグメントを濃度として 2 mg / mL、リン酸ナトリウムを 0.01 M、塩化ナトリウムを 0.15 M、およびポリソルベート 80 を 0.001 % 含有し、p H が 7.2 の溶液製剤である。本製剤は溶液製剤であるため、凍結乾燥製剤のように注射用水などで用時溶解して使用する必要はない。しかし、本製剤には、凍結を避け、冷所（2 ~ 8 °C）保存とすること、振盪を避け、投与前フィルターにより除粒子すること等、取扱い上いくつかの制限事項がある。かような制限事項があるため、本製剤は、取扱いににくい製剤であると考えられる。

したがって、これら取扱い上制限事項のない製剤の開発が強く要望されている。

本発明の目的は、凍結を避けた冷所保存、振盪を避けた移送・取扱い、用時フィルターによる除粒子操作等の使用制限のない、安定なヒト型化モノクローナル抗体

フラグメントを含有してなる非経口用医薬組成物あるいは非経口用医薬製剤並びにヒト型化モノクローナル抗体フラグメントの安定化方法を提供することにある。

## 発明の開示

かかる状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、国際公開WO 93/13133号公報（対応米国特許5 777 085、対応欧州特許E P 6 19 324）に記載された方法により製造されるヒト型化C 4 G 1 抗体をババイン処理により切断し、F a b フラグメントを作成した後、さらに該明細書の記載に従い精製されたヒト型化C 4 G 1 F a b フラグメントに、非イオン性界面活性剤、および糖類を添加し、さらに緩衝剤によりpHを弱酸性に調整することにより該F a b フラグメントを安定化させることを見出し、さらに継続して検討を行った結果、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、ヒト型化モノクローナル抗体フラグメント、非イオン性界面活性剤、および糖類を含有してなり、pHが弱酸性である非経口用医薬製剤に関する。詳細には、本発明は、ヒト血小板膜糖タンパク質G P I I b / I I I a のフィブリノーゲン受容体に対するヒト型化モノクローナル抗体のF a b フラグメントであるヒト型化モノクローナル抗体フラグメント、非イオン性界面活性剤、および糖類を含有してなり、pHが弱酸性である非経口用医薬製剤に関するものである。また、本発明は、非イオン性界面活性剤、および糖類を配合し、pHを弱酸性にすることによるヒト型化抗体フラグメントの安定化方法に関するものである。

本発明に用いられるヒト型化モノクローナル抗体フラグメントとしては、通常医薬品として治療上有効な薬理作用を有するものであれば特に制限されない。例えば、特開昭62-296890号公報（対応米国特許5 225 539、対応欧州特許2 394 00）あるいは国際公開WO 90/7861号公報（対応米国特許5 693 761、対応欧州特許4 51 216）などに記載されたヒト型化モノクローナル抗体を当該技術分野で周知の方法（例えば化学的手法あるいは酵素的手法）によりフラグメントとされたものであれば、いかなるフラグメントであっても、あるいは分子量であっても特に制限されない。また、例えばWO 93/13133号公報に記載された、直接遺伝子組み替え的に製造されたフラグメントであってもよい。好ましくは血小板の凝集阻止作用を有するものである。かかるフラグメントとしては、

例えば、ヒト血小板膜糖タンパク質G P I I b／I I I aのフィブリノーゲン受容体に対するヒト型化モノクローナル抗体のF a bフラグメントが挙げられる。かかるF a bフラグメントとしては、具体的には、国際公開WO 9 3／1 3 1 3 3号公報に記載された方法により製造されるヒト型化C 4 G 1抗体を当該技術分野で周知の方法による蛋白質分解酵素（例えば、ババイン）により切断し、F a bフラグメントを作成した後、さらに明細書の記載に従い精製されたヒト型化C 4 G 1 F a bフラグメントがさらに好ましい（後記図面を参照）。

本発明において、F a bフラグメントの量は、通常医薬品として治療上有効な薬理作用を有する量であれば特に制限されないが、好ましくは2 m g～1 0 0 m gであり、さらに好ましくは5 m g～5 0 m gである。

本発明において、F a bフラグメントの濃度は、通常非経口用医薬組成物を提供できる範囲であれば特に制限されないが、好ましくは0. 0 1 m g／m L～1 0 m g／m Lであり、さらに好ましくは0. 1～8 m g／m Lである。かかる濃度が0. 0 1 m g／m Lより薄い場合には、有効な薬理作用を発現させるための濃度を維持するためには、製剤が大型化し、医薬品製剤としての提供が事実上困難な場合もある。また、1 0 m g／m Lより高い場合は、フラグメントの飽和溶解度に近くなり、保存中に凝集物発生が懸念される。

本発明に用いられる非イオン性界面活性剤は、通常製薬的に許容されるものであれば特に制限されない。ここで、非イオン性界面活性剤とは、脂肪族アルコールのポリアルキレンジリコールエーテル、アルキルフェノールのポリアルキレンジリコールエステル等イオン性を示さない界面活性剤を意味する。例えば、ポリソルベート8 0、ポリソルベート2 0などが挙げられるが、好ましくはポリソルベート8 0であり、さらに好ましくは植物由来のポリソルベート8 0である。本発明の非イオン性界面活性剤は、1種または2種以上組合せて配合することもできる。

本発明において、非イオン性界面活性剤の濃度は、通常非経口用医薬組成物を提供できる範囲であれば特に制限されないが、好ましくは溶液中約 $1 \times 10^{-5}$ 重量%～1重量%の範囲であり、さらに好ましくは0. 0 0 0 1重量%～0. 1重量%である。かかる濃度が $1 \times 10^{-5}$ 重量%より薄い場合には、振盪により凝集物が発生することが懸念される。なお、本発明の非イオン性界面活性剤は、主に凝集物の生成を

抑制するため添加されるものである。

本発明に用いられる糖類としては、通常製薬的に許容されるものであれば特に制限されない。かかる糖類としては、例えばグルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトース等の单糖類、ラクトース、マルトース、精製白糖、ショ糖等の二糖類、マンニトール、ソルビトール、キシリトール等の糖アルコールなどが挙げられる。好ましくは、精製白糖および／またはマンニトールである。本発明の糖類は、1種または2種以上組合せて配合することもできる。なお、本発明の糖類は、主にヒト型化モノクローナル抗体を安定化させるため添加されるものであるが、医薬製剤の浸透圧を調整する、凍結乾燥したときに、再溶解が容易となるようマトリックス成分を非晶質に維持する等の機能を有するものである。

本発明において、糖類の濃度は、通常非経口用医薬組成物を提供できる範囲であれば特に制限されないが、好ましくは0.01重量%～50重量%であり、さらに好ましくは0.1重量%～10重量%である。かかる濃度が0.1重量%より薄い場合には、振盪により凝集物が発生しやすい状態になることが懸念される。また、50重量%より濃い場合には、糖類等が析出する可能性もある。また、この範囲であれば、凍結乾燥製剤とした場合、賦形剤としての効果もある。

本発明において、非経口用医薬組成物あるいは製剤のpHは、自体公知の方法により弱酸性にすれば特に制限されない。好ましくは、弱酸性に緩衝作用を有する物質（以下、緩衝剤と略記する）を配合することにより、pHが約4～6に調整される。本発明において弱酸性とは、pH値約4～6を意味する。pHが中性からアルカリ性の場合、不純物の増加や凝集物の増加等、著しく製剤の安定性を損なう。また、強酸性の場合、疼痛等が起こる等、注射剤として使用するには回避する方が望ましい。かかる緩衝剤としては、例えばリン酸緩衝剤（例えば、リン酸一リン酸一水素二ナトリウム緩衝液）、クエン酸緩衝液（例えば、クエン酸一水酸化ナトリウム）、酢酸緩衝液（例えば、酢酸一酢酸ナトリウム）、酒石酸緩衝液（例えば、酒石酸一水酸化ナトリウム）、リンゴ酸緩衝液（例えば、リンゴ酸一水酸化ナトリウム）、ヒスチジン緩衝液（例えば、ヒスチジン一塩酸）、アルギニン緩衝液（例えば、アルギニン一塩酸）等が挙げられる。非経口用医薬組成物が注射剤の場合、これらのナトリウム塩が好ましく、リン酸ナトリウム緩衝液および／またはクエン酸

ナトリウム緩衝液がさらに好ましい。本発明の緩衝剤は、1種または2種以上組合せて用いることもできる。

本発明において、緩衝剤の濃度は、通常非経口用医薬組成物を提供できる範囲であれば特に制限されないが、好ましくは1 mM以上であり、さらに好ましくは1 mM～500 mMである。かかる濃度が1 mMより薄い場合には、緩衝作用が弱すぎるため、pHを安定に保つことが困難である。500 mMを超える場合には、浸透圧が高くなるため、例えば注射用水などで用時稀釀して使用することもできるが、本発明の非経口医薬組成物または製剤を用時稀釀することなくそのまま使用するには、かかる濃度は1 mM～500 mMが好ましい。

本発明の実施により得られる非経口用医薬製剤は、通常製薬的に許容される剤形であれば特に制限されないが、好ましくは水性注射剤、非水性注射剤、用時溶解して用いる注射剤（例えば凍結乾燥法により粉末としたもの）等の無菌製剤である。なお、凍結乾燥の条件は、自体公知の条件を適宜設定することができる。

本発明の非経口医薬用製剤は、水性注射剤、非水性注射剤、用時溶解して用いる注射剤（例えば凍結乾燥法により粉末としたもの）等の無菌製剤として、通常密封容器内に保存されるが、その空間部は、酸素減少雰囲気下であることが好ましい。ここで酸素減少雰囲気下とは、大気中に存在する酸素を人工的に減少させた環境を意味する。かかるためには、例えば、密封容器内が不活性ガス（例えば、窒素ガス）により置換されるのが好ましい。さらに好ましくは窒素ガスである。また、ガス置換率としては、好ましくは90%以上であり、さらに好ましくは95%以上である。

本発明の非経口用医薬製剤の製造方法としては、自体公知の方法を採用することができるが、例えば国際公開WO 93/13133号公報に記載された方法により製造されるFabフラグメントに、非イオン性界面活性剤、糖類などの添加剤を混合・溶解した溶液と、最終の濃度になるように調整された希釀用緩衝液を混合することにより調整する方法が挙げられる。このとき、Fabフラグメント溶液の最終組成は、精製の最終段階の方法に影響されるため、Fabフラグメント溶液を限外ろ過等の方法により溶液組成交換または濃縮し、各成分の最終濃度を任意に設定することができる。

本発明の非経口用医薬組成物には、通常非経口用医薬組成物に添加される医薬品添加物（例えば、溶解補助剤、保存剤、安定剤、乳化剤、無痛化剤、等張化剤、緩衝剤、賦形剤、着色剤、増粘剤）を配合することもできる。例えば、溶解補助剤としては、シクロデキストリン類等が挙げられる。保存剤としては、バラ安息香酸メチル等が挙げられる。乳化剤としては、レシチン等が挙げられる。無痛化剤としては、ベンジルアルコール等が挙げられる。等張化剤としては、塩化ナトリウム等が挙げられる。賦形剤としては、マルトース等が挙げられる。増粘剤としては、ヒアルロン酸等が挙げられる。

### 図面の簡単な説明

図1はヒト型モノクローナル抗体のフラグメント(10)の製造過程を簡略に説明するものである。

図2は血小板凝集抑制薬（血小板凝集阻害剤）の作用機序を説明するものである。

本発明に用いられるヒト型モノクローナル抗体のフラグメント(10)は、図1と図2に示すように、ヒト血小板(12)表面上に存在する糖タンパク質GPIIb/IIIaのフィブリノーゲン受容体(14)に対するモノクローナル抗体をヒト型化(16)し、さらにパパイン処理(18)によりFabフラグメントとしたものである。

### (符号の説明)

10：フラグメント、12：ヒト血小板、14：フィブリノーゲン受容体、

16：ヒト型化抗体、18：パパイン処理

PL：リン脂質、PLC：ホスホリバーゼC、PLA<sub>2</sub>：ホスホリバーゼA<sub>2</sub>、

G：GTP結合蛋白、DG：1、2ジアシルグリセロール、

IP<sub>3</sub>：イノシトール1.4.5-3リン酸、CaM：カルモデュリン、

MLCK：ミオシン軽鎖キナーゼ、MLC：ミオシン軽鎖、

C-K：プロテインCキナーゼ、PDE：ホスホジエステラーゼ、

DTS：Dense tubular system

### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を示し、さらに具体的に説明するが、本発明の範囲を限定するものではない。

## [参考例]

ヒト型化モノクローナル抗体フラグメントは、以下の方法により得られた F a b フラグメントを使用した。すなわち、国際公開 WO 93/13133 号公報に記載された方法（実施例）により得られたヒト型化 C 4 G 1 抗体をババイン処理により切断し、F a b フラグメントを作成した後、さらに該明細書の記載に従い F a b フラグメントを精製し、ヒト型化 C 4 G 1 F a b フラグメント（以下、単に「F a b

フラグメント」と略記する)を得た。

[試験方法1] Binding-Inhibition活性による力価測定

GPIIb/IIaを固相化したプレートにビオチン化フィブリノーゲン溶液とFabフラグメント溶液を競合反応させ、アビジンパーオキシダーゼ溶液と発色させることにより、Fabフラグメント標準品に対する相対的な力価を測定する。

[試験方法2] 高速液体クロマトグラフ法による高分子不純物量の定量

Fabフラグメントを1mg含む溶液の20μlにつき、以下の条件の液体クロマトグラフ法により試験を行う。ピーク面積を自動積分法によりFabフラグメント以外のピーク面積の面積百分率を測定する。

検出器：紫外吸光光度計

カラム：内径約10mm、長さ約30cmのガラス管に13μmのデキストラン共有結合アガロースを充填する。

カラム温度：25度付近の一定温度

移動相：リン酸二水素ナトリウム3.12g及び塩化ナトリウム11.7gを900mlの水に溶かし、8N水酸化ナトリウム試液を加えてpHを7.0に調整した後、水を加えて1000mlにする。

液量：Fabフラグメントピークの保持時間が約38分になるように調整する。

[試験方法3] 目視による性状・凝集物の確認

2000ルクス～5000ルクスの照度下において、目視により液中の性状・凝集物量を比較する。

[実施例1～3] [比較例1～5]

Fabフラグメント濃度が約1mg/mLの精製品を限外ろ過することにより、濃度が3～6mg/mLのFabフラグメント水溶液に置換し、Fabフラグメント原薬とした。また、別途、最終メスアップ時の濃度が、それぞれFabフラグメント濃度2mg/mL、緩衝剤濃度10mM、ポリソルベート80濃度0.01重量%、精製白糖濃度5重量%になるように、表1に記載する各種緩衝液を調製し、上記原薬と混合し調製液を得た。本調製液を無菌ろ過後、無菌環境下で3～5mLずつ予め滅菌処理したバイアル瓶に充填し、凍結乾燥庫内で吸引及び復圧を繰り返すことによりバイアル瓶内のヘッドスペースを窒素に置換し、その後、打栓閉塞を

行い、本発明製剤を得た。本発明製剤および比較製剤を40°Cおよび60°Cで保存し、安定性について比較検討した。

試験結果を表1に示す。表1からも明らかなように、比較例のpHでは、過酷(高温)条件下高分子不純物が増え、また白濁するのに対し、本発明のpHでは、力価の低下は認められなかった。したがって、本発明製剤は、安定性が非常に高い製剤であることが言える。

(表1)

	緩衝剤	pH	結果	上段：力価(%)		
				中段：性状		
				下段：高分子量不純物(%)		
			初期	40°C 1箇月	60°C 4週	
実施例1	リン酸ナトリウム	4.90	100	100	72	
			無色	—	無色	
			0.02	0.07	1.51	
実施例2	リン酸ナトリウム	5.95	100	100	81	
			無色	—	無色	
			0.03	0.10	1.08	
実施例3	クエン酸ナトリウム	5.21	100	81	77	
			無色	—	無色	
			0.06	0.04	2.40	
比較例1	リン酸ナトリウム	7.03	100	91	59	
			無色	—	白濁	
			0.03	0.17	1.69	
比較例2	リン酸ナトリウム	7.85	100	—	—	
			無色	—	白濁	
			0.04	0.39	10.72	
比較例3	クエン酸ナトリウム	7.14	100	68	56	
			無色	—	白濁	
			0.13	0.13	2.78	
比較例4	リン酸ナトリウム	9.04	100	—	—	
			無色	—	白濁	
			0.04	1.48	62.06	
比較例5	トリスー塩酸	7.16	100	83	80	
			無色	—	白濁	
			0.07	1.62	0.64	

[実施例4～9] [比較例6～7 (ポリソルベート80)]

Fabフラグメント濃度が約1mg/mLの精製品を限外ろ過することにより、

濃度が3～6 mg/mLのF a b フラグメント水溶液に置換し、F a b フラグメント原薬とした。また、別途、最終メスアップ時の濃度が、それぞれF a b フラグメント濃度2 mg/mL、リン酸ナトリウム濃度10 mM、精製白糖濃度5重量%になるように緩衝液を調製し、上記原薬と混合し調製液を得た。本調製液を無菌ろ過後、無菌環境下で3～5 mLずつ予め滅菌処理したバイアル瓶に充填し、凍結乾燥庫内で吸引及び復圧を繰り返すことによりバイアル瓶内のヘッドスペースを窒素に置換し、その後、打栓閉塞を行い、本発明製剤を得た。本発明製剤および比較製剤を200 rpmで10分間振盪を行い、凝集物発生の有無を確認した。

試験結果を表2に示す。表2からも明らかなように、ポリソルベート80を1×10<sup>-5</sup>重量%以上含有することによって、振盪などの物理的ストレスを与えて、凝集物の生成を顕著に低減できることが判明した。

(表2)

	イオン性界面活性剤		凝集物目視確認
	種類	濃度(重量%)	
実施例4	ポリソルベート80	1	無し
実施例5	ポリソルベート80	0.1	無し
実施例6	ポリソルベート80	0.01	無し
実施例7	ポリソルベート80	0.001	無し
実施例8	ポリソルベート80	0.0001	無し
実施例9	ポリソルベート80	0.00001	無し
比較例6	ポリソルベート80	0.000001	あり
比較例7	ポリソルベート80	0	あり

#### [実施例10] [比較例8(糖類)]

F a b フラグメント濃度が約1 mg/mLの精製品を限外ろ過することにより、濃度が3～6 mg/mLのF a b フラグメント水溶液に置換し、F a b フラグメント原薬とした。また、別途、最終メスアップ時の濃度が、それぞれF a b フラグメント濃度2 mg/mL、リン酸ナトリウム濃度10 mM、ポリソルベート80濃度0.01重量%になるような緩衝液を用意し、上記原薬と混合し調製液を得た。本調製液を無菌ろ過後、無菌環境下で3～5 mLずつ予め滅菌処理したバイアル瓶に充填し、凍結乾燥庫内で吸引及び復圧を繰り返すことによりバイアル瓶内のヘッドスペースを窒素に置換し、その後、打栓閉塞を行い、本発明製剤を得た。本発明製

剤および比較製剤を60°Cで4週間保存し、凝集物発生の有無を確認した。

試験結果を表3に示す。表3からも明らかなように、精製白糖を添加した本発明製剤においては、保存時の凝集物の発生を防止することが可能であった。

(表3)

	糖		凝集物目視確認
	種類	濃度(重量%)	
実施例10	精製白糖	5	無し
比較例8	無し	0	不溶性異物あり

[実施例11]

Fabフラグメント濃度が約1mg/mLの精製品を限外ろ過することにより、濃度が3~6mg/mLのFabフラグメント水溶液に置換し、Fabフラグメント原薬とした。また、別途、最終メスアップ時の濃度が、それぞれFabフラグメント濃度2mg/mL、リン酸ナトリウム濃度10mM、ポリソルベート80濃度0.01重量%、精製白糖濃度5重量%になるような緩衝液を用意し、上記原薬と混合し調製液を得た。本調製液を無菌ろ過後、無菌環境下で3~5mLずつ予め滅菌処理したバイアル瓶に充填し、凍結乾燥庫内で吸引及び復圧を繰り返すことによりバイアル瓶内のヘッドスペースを95%窒素に置換し、その後、打栓閉塞を行い、製剤を得た。これを、40°C及び60°Cで保存し、その保存時の安定性を比較検討した。

(表4)

	窒素置換	pH	結果	上段: 力価(%)	
				下段: 高分子量不純物(%)	
			初期	40°C 3箇月	40°C 6箇月
実施例11	有り	5.95	100 0.02	92 0.29	85 0.67

### 産業上の利用の可能性

本発明の非経口用医薬組成物あるいは製剤は、溶液状態あるいは凍結乾燥状態において、優れた保存安定性を示し、室温保存が可能であり、また凝集物発生を抑制していることからフィルターによる除粒子工程が不要であり、簡便に使用できるという優れた効果を奏する。

## 請求の範囲

1. ヒト型化モノクローナル抗体フラグメント、非イオン性界面活性剤、および糖類を含有してなり、pHが弱酸性である非経口用医薬組成物。
2. ヒト型化モノクローナル抗体フラグメントが、ヒト血小板の凝集阻止作用を有するものである請求の範囲第1項記載の非経口用医薬組成物。
3. ヒト型化モノクローナル抗体フラグメントが、ヒト血小板膜糖タンパク質G P I I b / I I I a のフィブリノーゲン受容体に対するモノクローナル抗体のFabフラグメントである請求の範囲第1項または第2項に記載の非経口用医薬組成物。
4. Fabフラグメントの濃度が、0.01mg/mL～10mg/mLである請求の範囲第3項記載の非経口用医薬組成物。
5. さらに弱酸性に緩衝作用を有する物質を配合し、pHが約4～6に調整される請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の非経口用医薬組成物。
6. 弱酸性に緩衝作用を有する物質が、リン酸ナトリウムおよび／またはクエン酸ナトリウムである請求の範囲第5項記載の非経口用医薬組成物。
7. 弱酸性に緩衝作用を有する物質の濃度が、1mM～500mMである請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の非経口用医薬組成物。
8. 非イオン性界面活性剤が、ポリソルベート80である請求の範囲第1項ないし第7項のいずれか1項に記載の非経口用医薬組成物。
9. 非イオン性界面活性剤の濃度が、 $1 \times 10^{-5}$ 重量%～1重量%である請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の非経口用医薬組成物。
10. 糖類が、精製白糖および／またはマンニトールである請求の範囲第1項ないし第9項のいずれか1項に記載の非経口用医薬組成物。
11. 糖類の濃度が、0.01重量%～50重量%である請求の範囲第1項ないし第10項のいずれか1項に記載の非経口用医薬組成物。
12. 請求の範囲第1項ないし第11項のいずれか1項に記載された非経口用医薬組成物が、凍結乾燥されてなる非経口用医薬製剤。

- 1 3. 請求の範囲第 1 項ないし第 1 2 項のいずれか 1 項に記載された非経口用医薬組成物が、酸素減少雰囲気下に保存されてなる非経口用医薬製剤。
- 1 4. 非イオン性界面活性剤、および糖類を配合し、pHを弱酸性にすることによるヒト型化モノクローナル抗体フラグメントの安定化方法。
- 1 5. さらに酸素減少雰囲気下に保存することによる請求の範囲第 1 4 項記載のヒト型化モノクローナル抗体フラグメントの安定化方法。

図 1

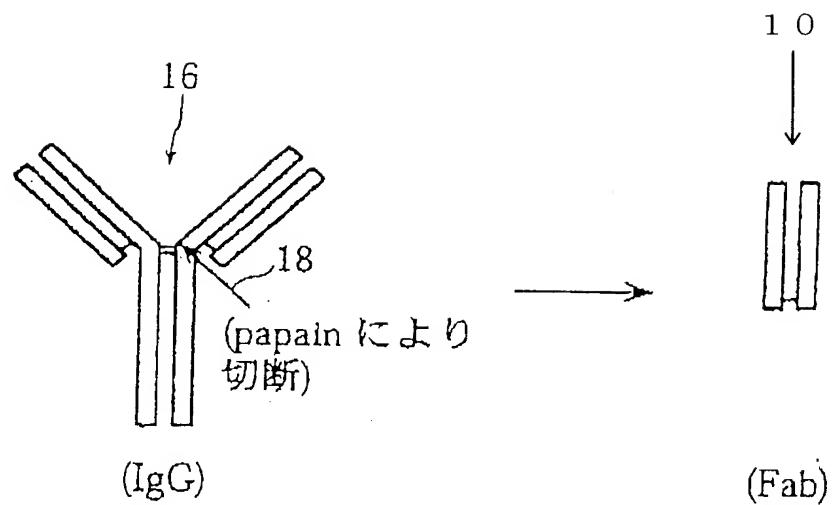
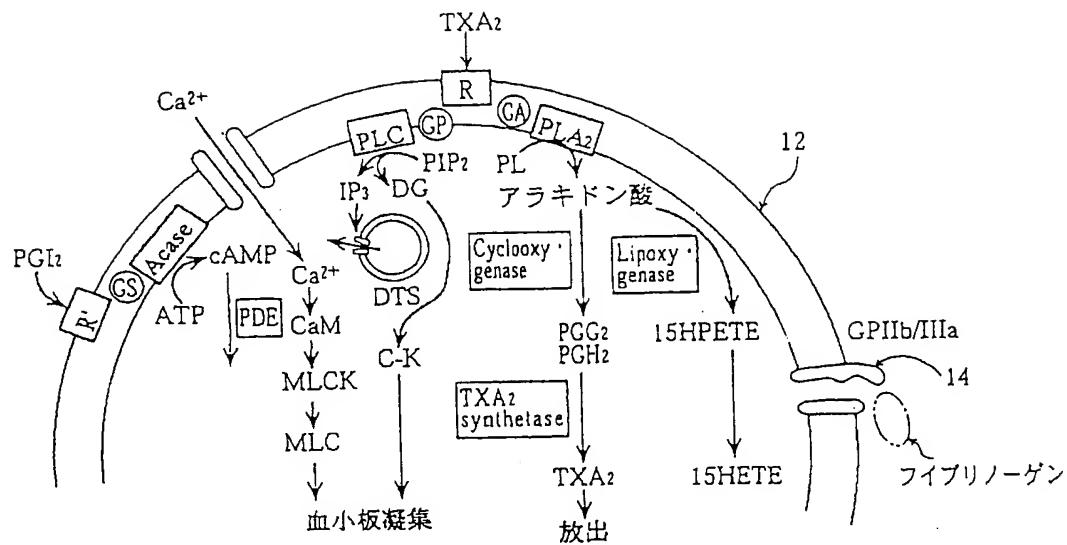


図 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02784

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> A61K39/395, 9/08, 9/19, 47/26, 47/34//C07K16/36  
C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K39/395, 9/08, 9/19, 47/26, 47/34//C07K16/36  
C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUSA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),  
JICST (JOIS), WPI-L (QUESTEL)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/22136, A2 (BOERINGER MANNEIM GMBH), 28 May, 1998 (28.05.98), Abstract, Claims; page 7, line 6 to page 10, line 13, implementation examples 1, 5 & EP, 852951, A1	1,4-12,14 2,3,13
X	US, 5656730, A (Enzon, Inc.), 12 August, 1997 (12.08.97), Claims; page 7, left column, lines 1-30, EXAMPLE 2 & US, 5917021, A	1,4-12,14 2,3,13
X	WO, 97/45140, A1 (GRAXO GROUP LIMITED), 04 December, 1997 (04.12.97), Abstract, Claims; page 4, line 20 to page 6, line 21 & EP, 907378, A1 & JP, 11-512753, A	1,5-9,11,14 2,3,13,15
X	EP, 865793, A1 (THE GREEN CROSS CORPORATION), 23 September, 1998 (23.09.98), Abstract, Claims; page 4, lines 27-39, & JP, 10-265406, A & JP, 10-265407, A	1,4,5,7-12, 14 2,3,13
X	JP, 9-77684, A (Green Cross Corporation),	1,4,5,7-12,



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
28 July, 2000 (28.07.00)

Date of mailing of the international search report  
08 August, 2000 (08.08.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP00/02784

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	25 March, 1997 (25.03.97), Abstract; Par. No. [0010]; [Production Example 2] (Family: none)	14 2,3,13
Y	WO, 93/13133, A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO.LTD.), 12 October, 1994 (12.10.94), Full text & EP, 619324, A1 & US, 5777085, A	2,3
Y	WO, 96/40250, A2 (CENTCOR, INC.), 19 December, 1996 (19.12.96), Full text & EP, 835135, A & JP, 11-511120, A	2,3
Y	EP, 158487, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 16 October, 1985 (16.10.85), Example 1, 9, 10, 12 & JP, 60-215631, A & JP, 60-222424, A & JP, 61-197527, A & US, 4645830, A & US, 4812557, A	13,15
Y	JP, 6-234659, A (Handai Biseibutsubyō Kenkyukai), 23 August, 1994 (23.08.94), Par. No. [0033] (Family: none)	13,15
A	US, 4093606, A (Myer Luis Coval), 21 August, 1979 (21.08.79) & FR, 2301266, A1 & US, 4165370, A & JP, 63-099022, A & JP, 6-080586, A	1-15
A	JP, 8-99900, A (Green Cross Corporation), 16 April, 1996 (16.04.96) (Family: none)	1-15
A	JP, 57-18627, A (Green Cross Corporation), 30 January, 1982 (30.01.82) (Family: none)	1-15
A	JP, 56-127321, A (Green Cross Corporation), 06 October, 1981 (06.10.81) (Family: none)	1-15

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K39/395, 9/08, 9/19, 47/26, 47/34//C07K16/36  
C12P21/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K39/395, 9/08, 9/19, 47/26, 47/34//C07K16/36  
C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUSA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),  
JICST (JOIS), WPI-L (QUESTEL)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/22136, A2 (BOERINGER MANNEIM GMBH) 28.	1, 4-12, 14
Y	5月. 1998 (28. 05. 98) Abstract, Claims, 第7ページ 第6行-第10ページ第13行、実施例1, 5 & EP, 852951, A1	2, 3, 13
X	US, 5656730, A (Enzon, Inc.) 12. 8月. 1997 (12. 08. 97) Claims, 第7ページ左欄第1-30行, EXAMPLE 2	1, 4-12, 14
Y	& US, 5917021, A	2, 3, 13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
& 同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

28. 07. 00

## 国際調査報告の発送日

08.08.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

検査下告印

4C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	WO, 97/45140, A1 (GRAXO GROUP LIMITED) 04.	1, 5-9, 11, 14
Y	12月. 1997 (04. 12. 97) Abstract, Claims, 第4ページ第20行-第6ページ第21行 & EP, 907378, A1&JP, 11-512753, A	2, 3, 13, 15
X	EP, 865793, A1 (THE GREEN CROSS CORPORATION) 23. 9月. 1998 (23. 09. 98) Abstract, Claims,	1, 4, 5, 7-12, 14
Y	第4ページ第27-39行 & JP, 10-265406, A&JP, 10-265407, A	2, 3, 13
X	JP, 9-77684, A (株式会社ミドリ十字) 25. 3月. 1997 (25. 03. 97) 【要約】、【0010】、	1, 4, 5, 7-12, 14
Y	【製造例2】 ファミリーなし	2, 3, 13
Y	WO, 93/13133, A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO. LTD.) 12. 10月. 1994 (12. 10. 94) 文献全体 & EP, 619324, A1&US, 5777085, A	2, 3
Y	WO, 96/40250, A2 (CENTCOR, INC.) 19. 12月. 1996 (19. 12. 96) 文献全体 & EP, 835135, A&JP, 11-511120, A	2, 3
Y	EP, 158487, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 16. 10月. 1985 (16. 10. 85) Example 1, 9, 10, 12 & JP, 60-215631, A&JP, 60-222424, A & JP, 61-197527, A&US, 4645830, A &US, 4812557, A	13, 15
Y	JP, 6-234659, A (財団法人阪大微生物病研究所) 23. 8月. 1994 (23. 08. 94) 【0033】 ファミリーなし	13, 15
A	US, 4093606, A (Myer Luis Coval) 21. 8月. 1979 (21. 08. 79) & FR, 2301266, A1&US, 4165370, A & JP, 63-099022, A&JP, 6-080586, A	1-15
A	JP, 8-99900, A (株式会社ミドリ十字) 16. 4月. 1996 (16. 04. 96) ファミリーなし	1-15
A	JP, 57-18627, A (株式会社ミドリ十字) 30. 1月. 1982 (30. 01. 82) ファミリーなし	1-15
A	JP, 56-127321, A (株式会社ミドリ十字) 06. 10月. 1981 (06. 10. 81) ファミリーなし	1-15